

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 924**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2014 PCT/EP2014/058445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2014 E 14720104 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2989468**

54 Título: **Ensayo de potencia basado en la línea celular monocítica humana de acetato de glatiramer**

30 Prioridad:  
**26.04.2013 WO PCT/EP2013/058787**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.03.2018**

73 Titular/es:  
**SYNTHON B.V. (100.0%)  
Microweg 22  
6545 CM Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:  
**KOLEN, SEBASTIANUS MARTINUS HENRICUS y  
WEIJTS, FRANCISCA ANTOINETTE ADRIANA**

74 Agente/Representante:  
**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 657 924 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ensayo de potencia basado en la línea celular monocítica humana de acetato de glatiramer

- 5 La presente invención se refiere a un método para determinar la potencia de un lote de acetato de glatiramer.

**Antecedentes de la invención**

10 La inflamación es una marca distintiva de la esclerosis múltiple (EM) que conduce a la desmielinización y pérdida axonal que da como resultado neurodegeneración. Aunque a veces se reclamó que la neurodegeneración puede ser independiente de la inflamación, estudios neuropatológicos recientes proporcionan clara evidencia de que cuando se ve destrucción activa de tejido en EM, se da en el entorno de la inflamación. Se ha asumido durante un largo tiempo que el factor de necrosis tumoral (TNF) de citocinas proinflamatorias y la interleucina-1 $\beta$  juegan una parte importante en la progresión y gravedad de la EM. Para impedir la inflamación en fisiología normal, las reacciones proinflamatorias están estrechamente relacionadas con rutas antiinflamatorias contrarreguladoras. La actividad de IL-1 $\beta$  es impedida por varias moléculas incluyendo el receptor de IL-1 señuelo II (IL-1RII) y su forma soluble y la forma secretada del antagonista del receptor de IL-1 (sIL-1Ra) que une IL-1RI sin desencadenar señalización. Tanto IL-1 $\beta$  como sIL-1Ra se producen principalmente por monocitos/macrófagos, los cuales, junto con los linfocitos T, son partes importantes del infiltrado celular en el sistema nervioso celular (SNC) de pacientes con EM.

20 La evidencia de la participación del sistema de IL-1 en EM, aunque abundante, continúa siendo indirecta. Se ha correlacionado una combinación de polimorfismos en los genes de IL-1 $\beta$  (IL1B) y sIL-1Ra (IL-1RN) con la gravedad de la enfermedad de EM. Se ha observado mayor producción *in vitro* de sIL-1Ra en portadores del alelo 2 de IL-1RN, con un indicio de una relación de dosis-efecto alélica. En un estudio que incluye 377 pacientes con EM, se encontraron asociaciones significativas entre los genotipos IL-1 y el resultado clínico. Posteriormente se demostraron las mismas tendencias en un segundo grupo independiente de 67 pacientes con EM progresiva primaria, sugiriendo que la inmunomodulación genéticamente determinada mediada por IL-1 influye en la prognosis a largo plazo en EM. Las familias que manifiestan alta relación de producción IL-1 $\beta$ /sIL-1Ra están en riesgo incrementado de tener una EM de comienzo relativo con la recaída que las familias con una baja relación. Además, IL-1 $\beta$  se expresa por todo el SNC particularmente en lesión inflamada, y caspasa-1 que se requiere para que el procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  activa se expresa en placas de EM. Se demostró evidencia directa de la participación del sistema IL-1 en el modelo animal para EM: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE). De hecho, ratones KO para tanto IL- $\alpha$  como IL-1 $\beta$  manifiestan resistencia a la inducción de EAE y gravedad de enfermedad reducida mientras que EAE era inducida en ratones IL-1Ra KO en ausencia de la toxina pertussis. Por último, pero no menos importante, el tratamiento de animales con EAE con sIL-1Ra recombinante redujo la gravedad de la enfermedad. Más recientemente, debido a la importancia de la IL-1 $\beta$  en la polarización de células TH17 T, se mostró que la inhibición de IL-1 $\beta$  junto con la de IL-23 por un inhibidor MEK/ERK perdía gravedad de EAE.

40 Los monocitos/macrófagos juegan una parte importante en la patogénesis de EM. Aunque la composición del infiltrado inflamatorio en el SNC varía dependiendo del tipo, fase y gravedad de EM, se piensa que los monocitos/macrófagos son efectores clave responsables del daño tisular. Predominan en lesiones de EM activas, y la presencia de productos de degradación de mielina dentro de los macrófagos es uno de los marcadores más fiables de la actividad de la lesión, y los mediadores proinflamatorios de monocitos/macrófagos activados contribuyen a la lesión de mielina. Aunque las citocinas proinflamatorias están implicadas en los mecanismos destructivos, también pueden participar en la reparación, por ejemplo, la proliferación de promotores de TNF de progenitores de oligodendrocitos y remielinización.

50 El acetato de glatiramer (AG) es un copolímero usado como un tratamiento inmunomodulador en esclerosis múltiple con recaída y remisión (EMRR). Aunque estudios *in vitro* demostraron que AG afecta a múltiples células diana, sus mecanismos de acción están escasamente entendidos. Previamente se ha mostrado que AG induce la producción de la forma secretada del antagonista del receptor de IL-1 (sIL-1Ra) en monocitos humanos y, por turnos, aumenta los niveles circulantes de sIL-1Ra en pacientes con EM. Véase D. Burger y col. en *PNAS*, 2009, Vol. 106, N° 11, páginas 4.355-4.359). Por tanto, IFN $\beta$  y AG, ambos inmunomoduladores usados con eficacia comparable en terapia de EM, inducen la producción del inhibidor de IL-1 $\beta$ , sIL-1Ra, en monocitos *in vitro* y aumentan los niveles circulantes de sIL-1Ra *in vivo*. La capacidad de sIL-1Ra circulante de cruzar la barrera sangre-cerebro indica que puede inhibir las actividades proinflamatorias de IL-1 $\beta$  en el SNC, un mecanismo particularmente importante respecto a AG cuya alta polaridad y naturaleza hidrófila es probable que impida la penetración de SNC. Por lo tanto, sIL-1Ra podría medir parte de los efectos antiinflamatorios beneficiosos de AG en la periferia y dentro del SNC.

60 El acetato de glatiramer (AG, COPAXONE®: 20 mg/ml de AG) fue aprobado por la FDA en 2002 para el tratamiento de formas de recaída de EM, incluyendo EMRR. AG es un copolímero y consiste en sales de acetato de polipéptidos sintéticos compuestos de aminoácidos de origen natural ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina en relaciones molares específicas. Para este fin, véase los documentos WO 95/31990 y US 3849550 citados en los mismos. Su actividad o potencia se ensaya convencionalmente en un modelo animal experimental, notablemente el modelo de ratón con encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Generalmente, la potencia de un lote de ensayo de AG se compara con un lote de referencia de AG. Sin embargo, estos estudios con animales son elaborados, caros y

usan grandes números de animales de ensayo, los cuales experimentan niveles significativos de molestia y, por tanto, hay una necesidad de un ensayo de potencia más rápido y barato que no requiera animales de ensayo.

5 El documento WO 03/048735 describe una primera mejora sobre el modelo *in vivo* de ratón de EAE convencional. Se refiere a un ensayo de potencia basado en célula de nódulo linfático de ratón *ex vivo*, que determina la cantidad de la citocina IL-2 secretada por dichas células, pero aún requiere inmunizar ratones femeninos con AG, sacrificar ratones después de la inmunización, y se dirige a linfocitos T en lugar de células monocíticas.

10 El documento WO 2008/157697 describe un método para ensayar un copolímero de aminoácido exponiendo simultáneamente células al copolímero en combinación con una citocina (proinflamatoria), y determinando la expresión de una proteína inducida por dicha citocina. El copolímero de aminoácido puede ser acetato de glatiramer. Ejemplos de células adecuadas incluyen células (mieloides) tales como células de leucemia monocítica aguda humana (THP-1), células de linfoma de monocito leucémico humano (U937), y células de leucemia promielocítica humana (HL-60). Ejemplos de citocinas adecuadas (proinflamatorias) incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-8 (IL-8). Ejemplos de proteínas reguladas por dichas citocinas incluyen proteína inducible 10 por  $\gamma$ -interferón (IP-10, CXCL10),  $\alpha$ -quimioatrayente de linfocito T inducible por interferón (I-TAC, CXCL11), y monocina inducida por  $\gamma$ -interferón (MIG, CXCL9).

20 La tabla 3 muestra la dependencia de dosis de AG (0 a 400 mg/ml) de la inducción mediada por IFN $\gamma$  (10 ng/ml) de IP-10, I-TAC, y MIG en células THP-1 y la descripción anterior de dicha tabla (en la página 23) menciona que el ensayo se puede usar para comparar dos o más preparaciones de copolímero. Sin embargo, los datos presentados no se pueden ajustar usando un modelo logístico de cuatro parámetros lineal o no lineal, como se describe en el capítulo <1034> de USP sobre el análisis de ensayos biológicos, incluyendo ensayos de potencia basados en célula. Por tanto, estos datos no son adecuados para determinar cuantitativamente la potencia de un lote de ensayo de AG en comparación con un lote de referencia de AG (véase los Ejemplos de más adelante).

30 Además, cuando se repiten estos experimentos, los presentes inventores encontraron que la concentración de acetato de glatiramer requerido para generar una respuesta de quimiocina (es decir, 100  $\mu$ g/ml, véase la Figura 2 de más adelante), induce muerte celular en células THP-1 activadas por IFN- $\gamma$  (véase la Figura 3 de más adelante).

Por lo tanto, hay necesidad de un ensayo de potencia basado en célula mejorado para AG, que se puede usar de manera rutinaria para determinar cuantitativamente la potencia relativa de un lote de AG en comparación con un lote de referencia de AG a concentraciones de AG que no afectan la capacidad celular.

### 35 Descripción detallada de la presente invención

La presente invención se refiere a un método para determinar la potencia de un lote de acetato de glatiramer que comprende estimular las células de la línea celular monocítica humana con una cantidad eficaz de interferón gamma (IFN $\gamma$ ), exponer dichas células a dicho lote de acetato de glatiramer (AG), y determinar la expresión de la citocina antiinflamatoria de monocito sIL-1Ra, es decir, la forma secretada del antagonista del receptor de IL-1.

45 En una realización de la presente invención, el método comprende además determinar la potencia relativa comparando la potencia de un lote de AG con la potencia de un lote de referencia de AG.

Una ventaja importante del método de la presente invención es que se usan células de la línea celular monocítica humana bien definida, que da resultados de ensayo reproducibles. Además, permite la cuantificación de potencia relativa entre lotes. Es más rápido y más barato, puesto que no implica ensayar con animales, lo cual aconsejan las autoridades reguladoras, y es clínicamente relevante puesto que determina la expresión de una citocina antiinflamatoria con efecto conocido en EM.

50 En el contexto de la presente invención, con acetato de glatiramer (AG) se quiere decir cualquier polipéptido sintético o copolímero compuesto de los aminoácidos tirosina (Y), ácido glutámico (E), alanina (A), y lisina (K) en todas las relaciones molares, así como variaciones conocidas de las mismas, en particular sus sales de acetato. Véase el párrafo que comienza con "Acetato de glatiramer" que une las páginas 1 y 2 del documento WO 03/048735 y las definiciones del "copolímero de aminoácidos" en las páginas 6 y 7 del documento WO 2008/157697, así como los documentos WO 95/31990 y US 3849550 citados en el mismo. Ejemplos adecuados de un lote de acetato de glatiramer para usar de acuerdo con la presente invención incluyen COPAXONE® (20 mg/ml de acetato de glatiramer) y alguna y todas sus versiones.

60 En el contexto de la presente invención, con una citocina antiinflamatoria de monocito se quiere decir cualquier molécula de señalización que es producida por cualquier célula del linaje monocítico y ejerce efectos inhibitorios (antiinflamatorios) sobre otras células del sistema inmune. De acuerdo con la presente invención, dicha citocina es la forma secretada del antagonista del receptor IL-1 (es decir, sIL-1Ra).

65

La Figura 1 muestra la expresión de sIL-1Ra de las células THP-1 después de la exposición a AG. Los datos de dosis-respuesta se ajustaron a un modelo logístico de cuatro parámetros para generar curvas.

La Figura 2 representa la curva dosis-respuesta derivada de los datos sobre IP-10 mostrados en la Tabla 3 del documento WO 2008/157697 en células THP-1 activadas por IFN $\gamma$  (10 ng/ml).

5 La Figura 3 muestra la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) inducida por acetato de glatiramer (como marcador de la muerte celular) en células THP-1 activadas por IFN $\gamma$  (10 ng/ml) a concentraciones de acetato de glatiramer (es decir, 100  $\mu$ g/ml) usadas en el documento WO 2008/157697 para generar una respuesta de quimiocina.

10 Células de línea celular monocítica humana particularmente útiles son las células de leucemia monocítica aguda humano (THP-1) y las células de leucemia monocítica humana Mono Mac 6 (MM6). Se encontró que las células de linfoma de monocito leucémico humano (U937) no son sensibles a AG. En una realización preferida de la presente invención, se usan células de leucemia monocítica aguda humana (THP-1).

15 Las células monocíticas humanas se introducen en un medio adecuado, por ejemplo, medio RPMI 1640, generalmente complementado con suero fetal bovino (FBS) y se estimulan con una cantidad eficaz de IFN $\gamma$ , se ponen en contacto con AG y se mide el efecto sobre la expresión de la citocina antiinflamatoria de monocito sIL-1Ra.

20 Los presentes inventores sorprendentemente han encontrado que se pueden obtener excelentes curvas dosis-respuesta cuando la expresión de sIL-1Ra se mide en células de línea celular monocítica humana que están estimuladas con IFN $\gamma$  cuando se exponen dichas células a cantidades relativamente bajas de AG, generalmente en el intervalo de 0,001 a 50  $\mu$ g/ml, preferiblemente en el intervalo de 0,001 a 20  $\mu$ g/ml. Se obtienen resultados menos significativos por encima de 50  $\mu$ g/ml, debido a que los resultados se pueden confundir mediante la inducción de muerte celular en el sistema celular en aquellas condiciones mostradas en la Figura 3.

25 Generalmente, los datos de sIL-1Ra se trazan en una gráfica frente al logaritmo de la concentración de acetato de glatiramer transformado (en log  $\mu$ g/ml). Las curvas dosis-respuesta se generan por activación de AG de las células monocíticas y los valores de CE50 se calculan usando un modelo logístico de parámetro no lineal sobre el semi-logaritmo de los datos transformados, coherentes con el capítulo <1034> de USP sobre el análisis de los ensayos biológicos.

30 En lugar de trazar en una gráfica los datos de sIL-1Ra calculados de nuevo usando una curva de calibración (en pg/ml), uno también puede trazar en una gráfica la absorbancia (OD<sub>450-570 nm</sub>) frente al logaritmo de la concentración de acetato de glatiramer transformada (en log  $\mu$ g/ml).

35 De acuerdo con el método de la presente invención se debería usar una cantidad eficaz de IFN $\gamma$ , y tales cantidades pueden ser diferentes para diferentes células de línea celular monocítica humana y también pueden variar de lote a lote de IFN $\gamma$ . La concentración eficaz óptima se puede determinar, por ejemplo, basándose en una calidad de curva de respuesta de sIL-1Ra. Dicha calidad de curva de respuesta de sIL-1Ra se puede generar en referencia a material de glatiramer y diferentes concentraciones del lote de IFN $\gamma$  a ensayar.

El intervalo que usa fuentes comercialmente disponibles de IFN $\gamma$  podría variar entre 0,05 y 100 ng/ml de IFN $\gamma$ .

45 En una realización típica de la presente invención cuando se determina la expresión de sIL-1Ra, se estimulan células monocíticas humanas, en particular células THP-1, con una concentración en el intervalo de 2 a 20 ng/ml.

50 La presente invención también se refiere a un proceso para preparar un lote de acetato de glatiramer (AG) que es aceptable para el uso farmacéutico que comprende a) preparar un lote de acetato de glatiramer, b) medir la potencia relativa de dicho lote de acuerdo con el método anteriormente descrito, y c) calificar el lote como aceptable para el uso farmacéutico si la potencia relativa cumple con las especificaciones predefinidas.

En una realización de la presente invención, dicho uso farmacéutico es para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM), en particular formas de recaída de EM, incluyendo EM con recaída y remisión (EMRR).

55 La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

#### Descongelación de células THP-1

- 60
- Añadir 10 ml de medio RPMI-1640 (Lonza/Cambrex, N°12-70F) con FBS al 10 % (suero fetal bovino) a un tubo estéril de 15 ml.
  - Separar un vial de células THP-1 (ATCC, N°TIB-202) del tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido y descongelar las células en el vial por agitación suave en un baño de agua a 37 °C  $\pm$  1 °C hasta casi estar totalmente descongelado.
  - Esterilizar la parte exterior del vial usando una toallita, puesto en remojo en etanol al 70 % (v/v).
- 65

## ES 2 657 924 T3

- Usando buena técnica aséptica, abrir el vial y transferir los contenidos del vial en un tubo Falcon, añadir 10 ml de RPMI-1640 precalentado más FBS al 10 %.
- Centrifugar a aproximadamente 200 g durante 5 minutos. Después, descargar el sobrenadante.
- Suspender de nuevo el pellet en 10 ml de RPMI-1640 precalentado más FBS al 10 %, y transferir la suspensión celular a un matraz de cultivo T-25.
- Colocar el matraz de cultivo celular T-25 en una incubadora humidificada a  $37 \pm 1$  °C y  $\text{CO}_2$  al  $5,0 \pm 1$  %.

### Subcultivo (paso) de células THP-1

- 10 • Las células THP-1 se subcultivaron cada 3 o 4 días.
- Recoger las células y centrifugar a 200 g durante 5 min. Suspender de nuevo el pellet en 10 ml con RPMI-1640 precalentado fresco más FBS al 10 %.
- Tomar una muestra para el recuento celular.
- Diluir las células a una densidad de  $2,0 \times 10^5$  células viables/ml con RPMI-1640 precalentado fresco más FBS al 10 %, y añadir 30 ml de la suspensión celular a un nuevo matraz de cultivo T-75.
- 15 • Colocar el matraz de cultivo T-75 en una incubadora humidificada a  $37 \pm 1$  °C y  $\text{CO}_2$  al  $5,0 \pm 1$  %.

### Preparar y almacenar soluciones madre de IFN $\gamma$

- 20 • IFN $\gamma$  pedido de R&D Systems (Nº285-IF) se debería almacenar a -20 °C antes de la reconstitución.
- Para reconstituir, añadir 0,5 ml de PBS estéril al vial de IFN $\gamma$  y dar vueltas suavemente hasta que se disuelva el polvo. La solución tiene una concentración de 0,2 mg/ml.
- Separar en alícuota la solución madre en 5x porciones de 100  $\mu$ l y almacenar los viales a -80 °C hasta su uso adicional.
- 25 • Descongelar un vial que contiene una alícuota de 0,2 mg/ml. Añadir 8910  $\mu$ l de PBS estéril a 90  $\mu$ l de alícuota de 0,2 mg/ml de IFN $\gamma$  y pipetear arriba y abajo. Separar en alícuotas en 25x porciones de 200  $\mu$ l y almacenar los viales a -80 °C hasta su uso adicional.

### Preparar la solución de trabajo de IFN $\gamma$

- 30 • Preparar la solución de trabajo de IFN $\gamma$  en el día de la puesta en marcha del método, descongelar una alícuota de IFN $\gamma$  que contiene 200  $\mu$ l con una concentración de 2  $\mu$ g/ml.
- Para cada placa, tomar 150  $\mu$ l de la alícuota de IFN $\gamma$  y diluir la solución con 5850  $\mu$ l de RPMI-1640 más FBS al 10 % a una concentración de 50 ng/ml. Esto es la solución de trabajo de IFN $\gamma$  y dará como resultado una
- 35 concentración final de 12,5 ng/ml en el ensayo.

### Sembrar la placa celular

- Se recogen las células THP-1 y se centrifugan a 200 g durante 5 minutos.
- 40 • Suspender de nuevo el pellet en 10 ml de RPMI-1640 precalentado fresco más FBS al 10 %. Tomar una muestra para el recuento celular.
- Después del recuento celular, ajustar la densidad celular a  $1,5 \times 10^6$  células/ml y añadir 100  $\mu$ l de la suspensión celular THP-1 a los pocillos de una placa de 96 pocillos.

### 45 Tratamiento de las células

- Preparar la serie de dilución de acetato de glatiramer. La concentración madre es de 20 mg/ml, la cual necesita ser diluida en RPMI-1640 más FBS al 10 % a una concentración madre de trabajo de 80  $\mu$ g/ml para la mayor dilución. Preparar una serie de dilución en RPMI-1640 más FBS al 10 % que comienza a una concentración de
- 50 80  $\mu$ g/ml bajando hasta 20 ng/ml.
- Añadir 50  $\mu$ l de la solución de trabajo de IFN $\gamma$  a la placa de ensayo que contiene las células. Añadir 50  $\mu$ l de las diluciones de acetato de glatiramer a la placa que contiene las células y la solución de trabajo de IFN $\gamma$ . El intervalo de dosis final de acetato de glatiramer está entre 20 y 0,005  $\mu$ g/ml.
- Incubar células durante 72 horas a 37 °C en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5 %, humedad al 93 %.

55

### Recogida de sobrenadante y ELISA

- Después de 72 horas de incubación centrifugar la placa de 96 pocillos a 200 g durante 5 minutos.
- Transferir 125  $\mu$ l del sobrenadante libre de célula/pocillo a una placa de almacenamiento.
- 60 • sIL-1Ra se determina en los sobrenadantes celulares usando el kit de ELISA de sIL-1Ra de Quantikine, R&D, Minneapolis, MN (Cat Nº DRA00B) seguido de las instrucciones del fabricante. El resto del sobrenadante se almacena en una placa de almacenamiento cerrada a -80 °C.

**Análisis de datos**

Se analizan los datos sobre la concentración de sIL-1Ra para la potencia relativa como se describe en el capítulo de USP <1034> sección 3.4 en modelos no lineales para respuestas cuantitativas. El paquete de programa informático GraphPad Prism (5.x) se usa para ajustar a un modelo no lineal a los datos:

- Los datos de sIL-1Ra (en pg/ml) se trazan en una gráfica frente al logaritmo de la concentración de acetato de glatiramer transformada (en log µg/ml).
- Se construye un modelo logístico de cuatro parámetros para ajustar las curvas dosis-respuesta de la Referencia (RS) y el lote de ensayo (TA). Para ensayar si las curvas dosis-respuesta para la Referencia y el lote de ensayo son paralelas (es decir, las curvas dosis-respuesta de la Referencia y el ensayo son idénticas en forma pero difieren solamente en una diferencia horizontal constante) se puede usar un ensayo de relación de probabilidad comparando los siguientes dos modelos: 1) modelos separados ajustados para la referencia y el lote de ensayo para la parte superior, inferior, pendiente y CE50, 2) modelo reducido con la parte superior común, inferior y pendiente ajustado a la Referencia y el lote de ensayo pero con un CE50 diferente. Los cuatro parámetros en estos ajustes son las asíntotas de la parte superior e inferior, la pendiente y la CE50. Se ensaya un logaritmo de la relación de probabilidad para determinar el paralelismo de resultados, puesto que el modelo reducido (asumiendo paralelismo) se continua en el modelo completo (libremente ajustando tanto las curvas de RS como de TA).

Tras la confirmación del paralelismo el modelo reducido se ajustará y la CE50 para la Referencia y el lote de ensayo se estimarán por CE50RS y CE50TA respectivamente. La potencia relativa del lote de ensayo se estimará como:

$$\text{Potencia relativa} = \text{CE50RS} / \text{CE50TA} * 100 \%$$

**Resultados mostrados en las Figuras 1 a 4**

La Figura 1 muestra la expresión de sIL-1Ra de células THP-1 después de la exposición a AG (lote Copaxone P53767). Las células se activaron en medio que contenía 12,5 ng/ml de IFN $\gamma$ . El protocolo se ejecutó como se describió anteriormente. Se muestran los resultados del lote de Copaxone (RS) y un lote TA que simula una muestra de potencia del 75 %. El paralelismo de los resultados se estableció como se describió anteriormente. La potencia relativa calculada para la muestra de potencia relativa nominal al 75 % basándose en la determinación de relaciones de la CE50 era del 66 %. La bondad del ajuste ( $R^2$ ) es de 0,98.

En la Figura 2, se representa la curva dosis-respuesta derivada de los datos en IP-10 mostrados en la Tabla 3 del documento WO 2008/157697. Como se puede ver, esta curva tiene una pendiente muy profunda, solamente un punto único en la parte inclinada de la curva, y un efecto gancho pronunciado a dosis altas. A partir de esta curva dosis-respuesta no se puede demostrar que un ensayo basado en célula THP-1 con IP-10 como respuesta es adecuado para cálculos de potencia. Resultados similares se obtuvieron para los datos I-TAC y MIG en la Tabla 3.

Además, la Figura 3 muestra que la concentración de acetato de glatiramer requerido para generar una respuesta de quimiocina (es decir, 100 µg/ml, véase Figura 3), induce a muerte celular en células THP-1 activadas por IFN $\gamma$ .

Los datos anteriores muestran que las líneas celulares monocíticas humanas se pueden usar para valorar la actividad o la potencia de AG después de la estimulación de dichas células por IFN $\gamma$ . El paralelismo de las curvas dosis-respuesta sigmoide de cuatro parámetros en la Fig. 1 indica que el ensayo con sIL-1Ra como respuesta es adecuado para calcular la potencia relativa de lotes frente a lote de referencia.

En presencia de IFN $\gamma$ , AG induce la secreción de sIL-1Ra de células THP-1. La lectura (sIL-1Ra) da como resultado curvas dosis-respuesta con forma S que se pueden ajustar por un modelo logístico de cuatro parámetros y es adecuado para cuantificar la potencia relativa. El parámetro de respuesta es muy sensible a AG y se pueden obtener curvas de respuesta completas a concentraciones que no afecta a la muerte celular

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para determinar la potencia de un lote de acetato de glatiramer que comprende estimular células de la línea celular monocítica humana con una cantidad eficaz de interferón gamma (IFN $\gamma$ ), exponer dichas células a dicho lote de acetato de glatiramer (AG) y determinar la expresión de la citocina antiinflamatoria de monocito sIL-1Ra.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** comprende además determinar la potencia relativa comparando la potencia de un lote de AG con la potencia de un lote de referencia de AG.
3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** AG es un copolímero que consiste en las sales de acetato de polipéptidos sintéticos compuestas por los aminoácidos tirosina, ácido glutámico, alanina y lisina en todas las relaciones molares.
- 15 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** dichas células monocíticas humanas se seleccionan de células de leucemia monocítica aguda humana (THP-1) y células de leucemia monocítica humana Mono Mac 6 (MM6).
- 20 5. Un método según la reivindicación 4, **caracterizado por que** dichas células son células THP-1.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** las células monocíticas humanas se ponen en contacto con 0,001 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de AG.
- 25 7. Un método según una cualquier de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** las células monocíticas humanas se estimulan con una concentración de IFN $\gamma$  determinada basándose en la respuesta de sIL-1Ra.

Figura 1

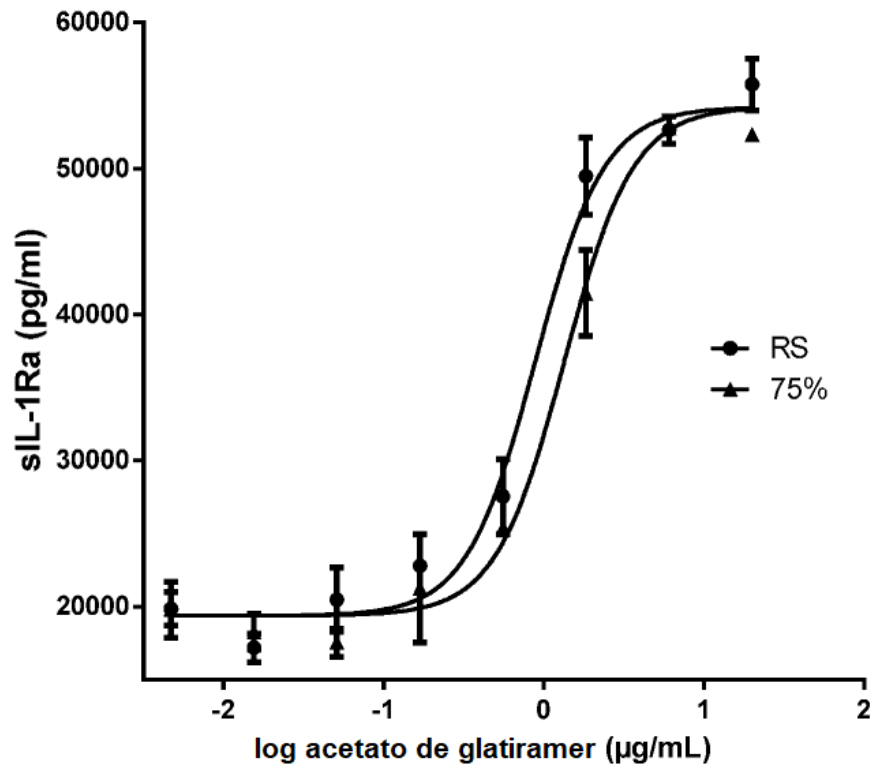




Figura 2

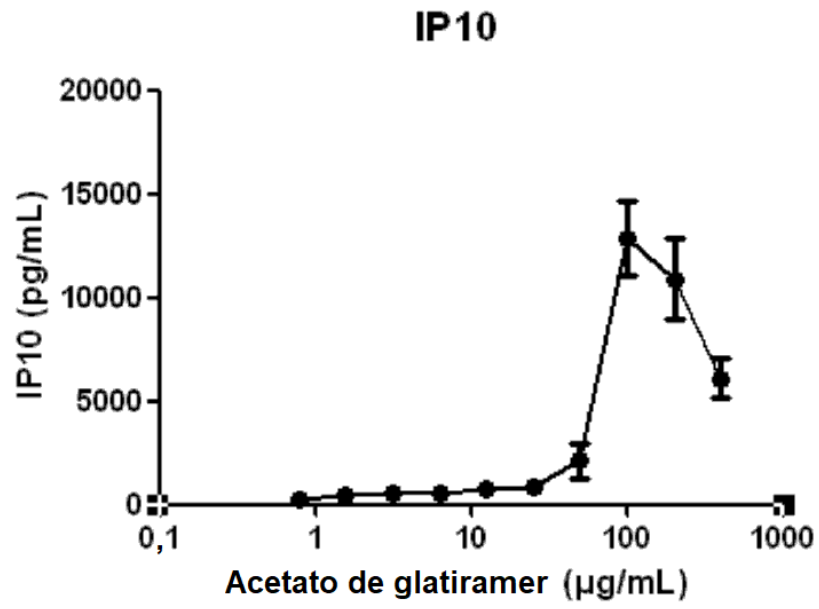


Figura 3

